

Tartu Ülikool
Psühholoogia instituut

Trine Uusen

**Neuropeptiid S-i ajuvatsakesesises manustamise mõju käitumisele
kõrge ja madala uudistamisaktiivsusega rottidel**

Seminaritöö

Juhendajad: Kadri Kõiv, Jaanus Harro

Läbiv pealkiri: NPS-i mõju käitumisele

Tartu 2014

Kokkuvõte

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida neuropeptiid S-i (NPS) mõju erinevusi kõrge (high exploratory - HE) ja madala (low exploratory - LE) uudistamisaktiivsusega rottide käitumisele. Selleks jagati loomad uudiskasti testi abil HE ja LE rühmadesse. Loomadele paigaldati paremasse ajuvatsakesse püsikanüül. Katsepäeval süstiti loomadele vastavalt NPS-i või Ringeri lahust ning uurimaks NPS-i mõju käitumisele, läbisid loomad 0-puuri testi, uudiskasti testi ning hele-tume puuri testi,

Tulemustest selgus, et NPS ei mõjutanud erinevalt uudiskasti testis ning hele-tume puuri testis HE ja LE grupi loomade käitumist. NPS-i mõjul suurenes nii HE kui ka LE loomade liikumisaktiivsus 0-puuri testis.

Märksõnad: Wistari rotid, uudistamisaktiivsus, neuropeptiid S

Abstract

Behavioral differences in response to intracerebroventricular neuropeptide S infusion in high and low exploratory rats

The aim of this study was to examine the differences in behavioral responses to neuropeptide S (NPS) in high and low exploratory rats (HE and LE, respectively). To do so, rats were first divided into HE and LE groups based on their results in exploration box test. Cannula was implanted into the right lateral ventricle. On the test day, rats received an injection of 5 µl either of Ringer solution or NPS. Injection was followed by elevated zero-maze test, exploration box test and light/dark test to explore the effects of NPS to their behavior.

The results showed that NPS effect did not differ in exploration box test and the light/dark test between LE and HE groups. Locomotor activity increased in both groups in response to NPS in the elevated zero-maze test.

Keywords: Wistar rats, exploratory activity, neuropeptide S

Sissejuhatus

Katseloomade jagamine huvi pakkuva spetsiifilise käitumusliku konstrukti alusel on võetud üha enam kasutusse farmakoloogiliste uuringute läbiviimisel (Thiel, Müller, Huston & Schwarting, 1999). Mitmed uuringud on näidanud, et rotid, olgugi identsed tõu, soo ja vanuse poolest, võivad süstemaatiliselt erineda käitumuslike vastuste poolest uudses keskkonnas. Selliseid erinevusi on võimalik seostada spetsiifiliste füsioloogiliste mehhanismidega. On leitud, et lokomotoorset vastust uudsusele võib seostada sõltuvuse ja stressimehhanismidega: kõrge uudistamisaktiivsusega loomadel on kõrgem lokomotoorne vastus amfetamiinile (Hooks, Jones, Smith, Neill & Justice Jr, 1991), eelsoodumus psühhostimulaatori eneselemanustamiseks (Pierre & Vezina, 1997) ning nad on tundlikumad kinnitustele ja stressoritele (Rouge-Pont, Piazza, Kharouby, Le Moal & Simon, 1993). Need käitumuslikud erinevused on seotud süstemaatiliste erinevustega ajus, eriti dopamiinisüsteemi talitlusega (Thiel et al., 1999).

Uues keskkonnas mõjutavad käitumist konfliktid motivaatorid – hirm ja uudishimu. Uudiskasti testiga on võimalik jagada loomad rühmadesse, kes on püsivalt kõrge neofobia/madala motivatsiooniga (*low exploratory* - LE) ning madala neofobia/kõrge motivatsiooniga (*high exploratory* - HE) uudistamise suhtes (Mällo, Altho, Kõiv, Tõnissaar, Eller & Harro, 2007). Mällo ja kolleegid (2007) leidsid oma uurimuses, et HE rotid olid uudiskasti testis märkimisväärselt aktiivsemad kui LE rotid ning vähemärevad tõstetud pluss-puuris.

Neuropeptiid S (NPS) on 20 aminohappest koosnev neuropeptiid (Xu et al., 2004). Neuropeptiid S reguleerib mitmeid bioloogilisi funktsioone, aktiveerides selektiivselt NPS-i retseptorit. NPS töötab kui neuromodulaator ning mõjutab ärgastuse ja ärevusega seotud käitumisi närilistel retseptori NPSR1 kaudu (Rizzi et al., 2008; Xu et al., 2004). NPS edendab ärevust ja paanikat vähendavaid efekte hiirte tõstetud T-puuris NPS-i retseptori selektiivse aktivatsiooni kaudu (Pulga, Ruzza, Rizzi, Guerrini & Calo, 2012). Farmakoloogilised ühendid, mis vähendavad ärevust (näiteks bensodiasepiinid), tüüpiliselt vähendavad ka ärgastust ja aktiivsust, kuid NPS-süsteem toimib teisiti. Loomkatsed on näidanud, et ajusisene NPS-i manustamine põhjustab anksiolüütikumi/trankvillisaatori laadset efekti ning ärgastust samaaegselt (Lukas & Neumann, 2012; Rizzi et al., 2008; Wegener et al., 2012; Xu et al., 2004). NPS-il on otsene mõju hüpotaalamuse-ajuripatsi-neerupeerilise stressiteljele hüpotaalamuse tasandil, kutsudes esile plasma adrenokortikotroopse hormooni ja kortikosterooni taseme tõusu (Smith et al., 2006).

Ajusisene NPS-i manustamine muudab ärksamaks, vähendab ärevat käitumist ning põhjustab hüperaktiivset käitumist (Xu et al, 2004). Avarvälja testi tulemused näitasid, et NPS suurendas märgatavalt sisenemiste arvu keskvälja esimese 10 minuti jooksul, mis viitab anksiolüütilisele efektile. Samas suurendas sama annus NPS-i liikumist avarvälja välimistes tsoonides, mis on kooskõlas NPS-i ärgastava efektiga.

Rizzi et al. (2008) tööst selgub, et NPS-i anksiolüütikumi laadne efekt avaldus sõltuvalt doosist, suurendades aega, mis loomad veetsid tõstetud plusspuuris avatud aladel. Uurimuse tulemusena väideti, et NPS käitub uudselt ärgastuse ja ärevusega seotud käitumise modulaatorina, mis avaldub unikaalse efektide muustrina: anksiolüüsiga seostatud stimulatsiooniga. Väideti, et NPS-i retseptori ligandid võivad esindada innovatiivseid ravimeid unetuse ja ärevushäirete ravis.

Individuaalne haavatavus narkootikumide vastuvõtlikkusele on inimestel sõltuvuse tekkimises olulisel kohal. Katsed rottidega on näidanud, et psühhostimulandi eneselemanustamise riskiga rotte on võimalik ära tunda nende lokomotoorse reaktiivsuse järgi stressisituatsioonis, näiteks uues keskkonnas. Tulemused näitavad, et potentsiaalsed teraapilised strateegiad sõltuvuse ravis peaksid võtma arvesse projektsioonisüsteemide heterogeensuse, mitte kontsentreeruma nii väga üksikule neurotransmitterile (Piazza et al., 1991).

Wegener et al. (2012) leidsid, et NPS-il oli märkimisväärne anksiolüütiline mõju erinevate rotiliinide puhul, kuid see ei muutnud depressiooniga seotud käitumist ühegi rotiliini puhul, hoolimata olulistest sünnipärastest erinevustest liinide vahel. Need tulemused viitavad sellele, et NPS spetsiifiliselt muudab ärevusega seotud käitumist, kuid ei suuda mõjustada geneetiliselt vahendatud depressiooni fenotüüpi.

Elamustejanu on inimese iseloomujoon, mida iseloomustab vajadus mitmekesiste, uudsete ja komplekssete tunnete järele ning üldine riskirohkete tegevuste nautimine (Dellu, Mayo, Piazza, Le Moal & Simon., 1993). Analoogiaid võib leida ka loomade käitumuslike kalduvuste hulgast. Uuringud on näidanud, et kõrge uudistamiskäitumisega loomad on kõrge reaktiivsusega uudes keskkonnas ning samuti vastuvõtlikud narkootikumide manustamisele, võrreldes madala uudistamiskäitumisega rottidega. Dellu ja kolleegide (1993) uurimuse tulemused näitasid, et heletume puuris sisenesid kõrge uudistamisaktiivsusega rotid valgustatud alasse kiiremini ning tihedamalt kui madala uudistamisaktiivsusega rotid. Sellegipoolest ei erinenud sisenemiste arv terve testimise perioodi jooksul nende kahe grupi puhul, mis viitab sellele, et kõrge

uudistamisaktiivsusega rottide käitumine polnud tingitud üldisest lokomotoorsest hüperaktiivsusest. Seega, kõrge uudistamisaktiivsusega rotid näitasid suurenenud lähenemist keskkonnale, mida üldiselt peetakse rottide jaoks vastumeelseks. Sarnaseid jooni võib analoogselt leida ka kõrge elamustejanuga inimeste seast.

Hele-tume puuri test põhineb näriliste loomupärasel vastumeelsusel eredalt valgustatud alade suhtes (Crawley & Goodwin, 1980). Konflikt ilmneb situatsioonides, kus loom on uues keskkonnas või uute objektide läheduses, kuna uudistamissoov ning tundmatute olukordade vältimise soov lähevad omavahel vastuollu. Uudistamisaktiivsus näitab nende soovide ühendatud tulemust uudsetes situatsioonides. Seega peetakse hele-tume puuris ravimite mõjul käitumisaktiivsuse tõusu valgustatud alas anksiolüütilise aktiivsuse indeksiks. Anksiolüütilise aktiivsuse näitajaks peetakse tõusu üleminekutes ilma tõusuta spontaanses liikumises (Bourin & Hascoët, 2003).

Tõstetud 0-puuri test kujutab endast muudetud kujul pluss-puuri testi, millega on võimalik mõõta rottide ärevust (Shepherd, Grewal, Fletcher, Bill & Dourish, 1994). Selle disain eemaldab avatud alas veedetud aja mitmetähendusliku tõlgendamise võimaluse, mis tekkis pluss-puuris keskse ruudu olemasolu tõttu. Kulkarni, Singh ja Bishnoi (2007) uurisid erinevatesse gruppidesse kuuluvate anksiolüütikumide (bensodiasepiinid, barbituraadid, alkohol jne.) mõju loomade käitumisele ning leidsid, et 0-puuri test oli võrreldes pluss-puuri testiga parem meetod, uurimaks ärevusega seotud käitumisi.

Uurimuse eesmärk

Käesoleva uurimuse eesmärgiks on välja selgitada NPS-i mõju kõrge ja madala uudistamisaktiivsusega rottide käitumisele.

Eelpool välja toodud tulemuste põhjal, mis on näidanud NPS-i ärevust vähendavat ning samas ärgastavat mõju (Pulga et al., 2012; Lukas & Neumann, 2012; Rizzi et al., 2008; Wegener et al., 2012; Xu et al., 2004) püstitati järgnev hüpotees: NPS-i manustamine muudab madala uudistamisaktiivsusega rottide käitumise sarnaseks kõrge uudistamisaktiivsusega rottide käitumisele.

Meetod

Üldine protseduur

Uuringus kasutati isaseid Wistar liini rotte (Harlan Laboratories, Holland). Kõik rotid kaalusid eksperimendi protseduuride alguses 272-400g ning majutati neljakaupa loomaruumi, mille temperatuur oli $21\pm 1^{\circ}\text{C}$ ning valgustsüklil koosnes 12-tunnisest valgusajast (08:00-20:00) ja 12-tunnisest pimedast ajast (20:00-08:00). Toidupelletitele (Lactamin R70, Rootsi) ja veele oli loomadel piiramatult ligipääs. Kõik käitumiskatsed viidi läbi spetsiaalselt varustatud ruumides ajavahemikus 11:00-18:00.

Kahe kuu vanused rotid eelselekteeriti uudiskasti testi alusel kõrge ja madala uudistamisaktiivsusega gruppidesse. Järgnevalt opereeriti loomadele paremasse ajuvatsakesse püsikanüül. Nädal pärast operatsiooni alustati käitumiskatsetega. Loomadele manustati vastavalt Ringeri lahust või NPS-i. Kohe pärast süsti asetati loomad kodupuuri ning 30 minuti jooksul registreeriti ultrahelihaälitsusi, millele järgnesid 0-puuri test, uudiskasti test ning hele-tume puuri test.

Ravimid

Roti NPS (Ser-Phe-Arg-Asn-Gly-Val-Gly-Ser-Gly-Val-Lys-Lys-Thr-Ser-Phe-Arg-Arg-Ala-Lys-Gln) (Sigma-Aldrich Co, USA) lahjendati Ringeri lahusega (140 mM NaCl, 4 mM KCl, 1.2 mM CaCl_2 , 1.0 mM MgCl_2 , 1.0 mM Na_2HPO_4 , 0.2 mM NaH_2PO_4 ; pH 7.2) kuni lõplikuks kontsentratsiooniks saadi 1.0 nmol/5 μl (Wegener et al., 2012). Kontrollgrupi loomadele süstiti 5 μl Ringeri lahust. NPS-i hoiti alikvootidena -80°C juures. Kõiki ravimeid hoiti protseduuride ajal jää peal.

Stereotaktiline operatsioon

Kõik kirurgilised protseduurid viidi läbi poolsteriilsetes oludes. Enne operatsioone majutati loomad üksikult ning anesteseeriti ketamiini ja medetomidini kombineeritud lahusega (vastavalt 45 mg/kg ning 0.2 mg/kg i.p. - intraperitonaalselt). Anesteseeritud loomad kinnitati stereotaktilise raami külge (David Kopf, USA) ning loomade kehatemperatuuri jälgiti rektaaltermomeetri abil. Järgnevalt siirdati neile 13 mm pikkune 22 G ajuvatsakesesisene (i.c.v) püsikanüül paremasse külgvatsakesse (AP +0.6, L -1.3, DV -4.0, Paxinos & Watson, 2007), mis kinnitati kahe roostevabast terasest kruviga ning hambaakrüülga. Püsikanüüli sisse pandi *dummy*-kanüül. Operatsioonijärgselt süstiti loomadele nahaaluselt ampitsilliini (100 mg/kg s.c.), butorfanooli (2 mg/kg s.c.), karprofeeni (0.2 mg/kg s.c.) ja 2.5 ml steriilset soolalahust kõhuõõnde ning asetati kodupuuri taastuma. Rotte jälgiti

igapäevase kaalumise ja patsutamise (*handling*), lisaks eemaldati *dummy*-kanüüle nädala jooksul kahel korral, et harjutada loomi hilisema ajjusüsti protseduuriga ning minimaliseerida stressireaktsiooni katsepäeval.

Ajuvatsakesse manustamise protseduur

Infusiooniks sisestati 14 mm pikkune 27 G kanüül 2-cm polüamiin tuubi (0.38 mm sisemine diameeter, 1.09 mm välimine diameeter), mis oli ühendatud 8 cm pikkuse FEP-tuubiga (0.12 mm sisemine diameeter, 0.68 mm välimine diameeter), mis omakorda oli kinnitatud 10 µl Hamiltoni süstla (Hamilton Syringes, Šveits) külge. Infusioonisüsteem täideti vastavalt 5 µl NPS või Ringeri lahusega, mis seejärel 1 minuti jooksul aju süstiti ning lisaks hoiti aine hajumise jaoks paigas veel 30 sekundit. Kohe pärast süsti asetati loomad tagasi kodupuuri ning 30 minuti jooksul registreeriti ultrahelihäälitsusi.

Eksperimenti lõpus süstiti rottidele i.c.v. 5 µl metüülroheline lahust (Applichem, Saksamaa), et määrata kindlaks sondi asetus ning seejärel dekapiteeriti.

Lõplikusse andmeanalüüsi jäid loomad, kelle püsikanüüli lokaliseerimine oli õige (n=36), moodustades järgnevad grupid: HE Ringer (n=7), HE NPS (n=9), LE Ringer (n=10) ning LE NPS (n=10).

Uudiskasti test

Rottide uudistamiskäitumise uurimiseks kasutati sarnaselt Mällo ja kolleegide (2007) uurimusele uudiskasti, mis oli 50x100cm metallist kast, mille seinte kõrgus oli 40cm. Uudiskasti nurgas asus "kodukamber" (20x20x20cm). Avatud alas asetati 4 eset (kolm uut ja üks tuttav) kindlatesse kohtadesse, mis olid terve eksperimenti jooksul samad. "Kodukamber", mille põrand oli kaetud saepuruga, oli otseselt ühendatud avause (20x20 cm) kaudu avatud alaga. Avatud ala puhastati niiske paberrätikuga pärast iga looma. Uudiskasti põrand oli jagatud kaheksaks võrdse suurusega ruuduks, kuhu oli asetatud neli objekti: klaaspudel, pappkast, puuklots ja toidupala. Esimesed kolm neist olid roti jaoks uudsed stiimulid, viimane aga tuttav. Uudiskasti test algatati roti panekuga "kodukambrisse", mis seejärel kaeti kaanega. Vaatleja jälgis järgnevaid aspekte: avatud alasse nelja käpaga sisenemise latents, avatud alale lähenemised (esikäpad avatud alas, väljavenitatud kehahoiak, kuid avatud alasse nelja käpaga mitte sisenemine), sisenemiste arv avatud alasse, jooneületused, tagakäppadele tõusud, kolme uue eseme uudistamine avatud alas, avatud ala uudistamiseks kulutatud aeg. Jooneületuste, tagakäppadele tõusude ja objektide uurimise korrad

summeeriti iga looma puhul uudistamisjuhtude summaks. Üks testisessioon kestis 15 minutit ning eksperimendid viidi läbi hämaras valguses (4-5 lx avatud alas).

Mällo et al. (2007) leidsid, et esimese uudiskasti sessiooni tulemused ei korreleeru järgnevate sessioonide tulemustega, kuid juba teise testimiskorraga saab määrata looma uudistamisfenotüübi. Seega viidi iga loomaga viidi test läbi kahel järjestikusel päeval ning kõrge ja madala uudistamisaktiivsusega gruppidesse jaotati rotid teise katsepäeva andmete põhjal.

0-puuri test

Sarnaselt Peet (2013) uurimusele kasutati käesolevas töös 0-puuri, mille näol on tegu maapinnast kõrgemale tõstetud sõõrikujulise tasapinnaga, mis on jaotatud neljaks osaks. Esimene ja kolmas veerand on ümbritsetud seintega (suletud alad), teise ja neljanda veerandi puhul seinad puuduvad (avatud alad, 5-11 lx). Mida rohkem aktiivsust näitab loom üles seoses avatud osaga, seda madalamaks loetakse ta stressitase (Braun, Skelton, Vorhees & Williams, 2011). Antud katses kasutati 105 cm läbimõõduga null-puuri, mis oli maapinnast 72 cm kõrgusel. Sõõri laius oli 10 cm ning seinte kõrgus 28 cm. Iga rott läbis testi ühe korra, mille ajal viibis ta null-puuris 5 minutit. Pärast iga looma puhastati 0-puuri niiske paberrätikuga. Katse alguses asetati rott null-puuri suletud alasse. Mõlemad avatud osad olid jagatud joonte abil kolmeks võrdseks osaks, mille ületamist katses jälgiti.

0-puuri testis jälgiti järgmisi aspekte: avatud alas viibitud aeg, avatud alasse sisenemise latents, jooneületuste arv, avatud alale lähenemised ning avatud alasse sisenemiste arv.

Hele-tume puur

Käesolevas töös kasutati sarnaselt Mällo (2008) uurimusele hele-tume puuri (30x60x40 cm), mis oli valmistatud metallist ning koosnes kahest seinaga eraldatud sama suurusega (30x30 cm) osast. Kahe osa vahelises seinas oli ava (10x10 cm), mille kaudu oli rottidel võimalik ühest osast teise liikuda. Pime osa oli pealt kaetud, valgustatud osa aga pealt lahtine ning tugevalt valgustatud (keskel 85 lx, nurkades 105-130 lx). Testi alguses asetati rotid kahte osa eraldava ava juurde, koonuga pimedasse alasse. 5 minuti jooksul registreeriti heledasse alasse sisenemise latents, heledale alale lähenemiste arv, heledas alas viibitud aeg, jooneületuste arv, tagakäppadele tõusude arv heledas alas ning heledasse alasse sisenemiste arv. Pärast iga looma puhastati hele-tume puuri niiske paberrätikuga.

Andmetöötlus

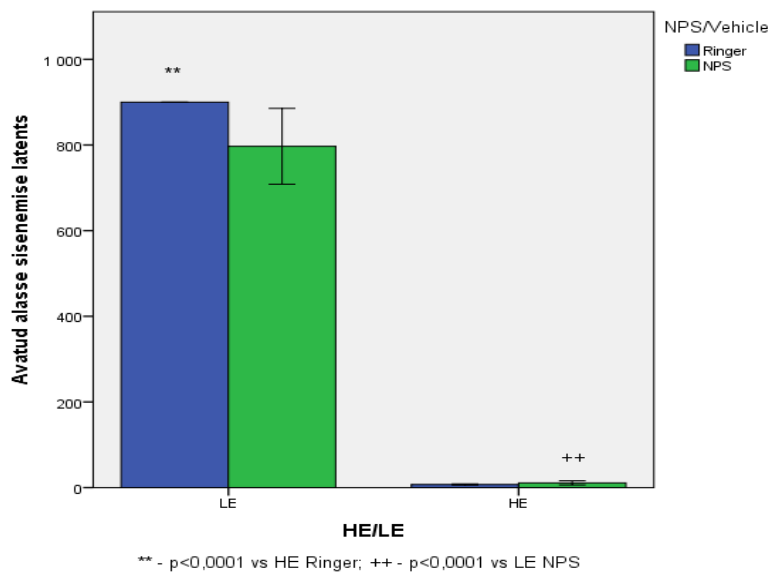
Andmetöötlus viidi läbi kasutades andmetöötlusprogrammi SPSS Statistics 20. Keskmiste võrdlemiseks kasutati kahefaktorilist dispersioonanalüüsi, *post hoc* testina Fisheri LSD testi ning korrelatsiooni uurimiseks Pearsoni korrelatsioonikordajat. Olulisuse nivoo $\alpha=0,05$.

Tulemused

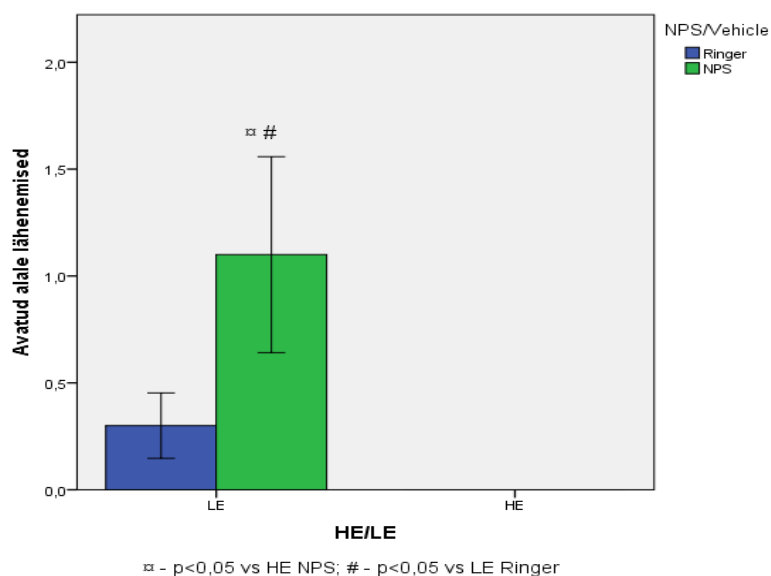
Uudiskasti test

Rotid klassifitseeriti palju- ja väheuudistavateks teise uudiskastipäeva uudistamisjuhtude summa alusel. Keskmine uudistamisjuhtude summa oli HE grupil 233,25 ($\pm 21,11$) ja LE grupil 4,8 ($\pm 8,31$). Esimese ja teise päeva uudistamisjuhtude summade vahel oli tugev positiivne korrelatsioon $r=0,94$, $p<0,001$.

Eelselektiooni teise päeva ning katsepäeva uudistamisaktiivsuse vahel oli tugev positiivne korrelatsioon $r=0,73$, $p<0,001$. Katsepäeval, mil pooltele rottidele oli manustatud NPS-i, pooltele lahustit, ilmnes ANOVA põhjal, et avatud alasse sisenemise latents (Joonis 1) ning avatud alale lähenemiste arv (Joonis 2) olid HE loomadel oluliselt madalamad kui LE loomadel ($F(1, 32)=280,14$, $p<0,0001$; $F(1, 32)=6,58$, $p<0,05$). Avatud alasse sisenemise latentsi osas ilmnes LSD *post hoc* testi alusel, et HE ja LE grupi siseselt ei olnud statistiliselt olulisi erinevusi. Avatud alale lähenemisi tegid LE NPS grupi loomad aga oluliselt rohkem kui kontrollgrupi loomad.

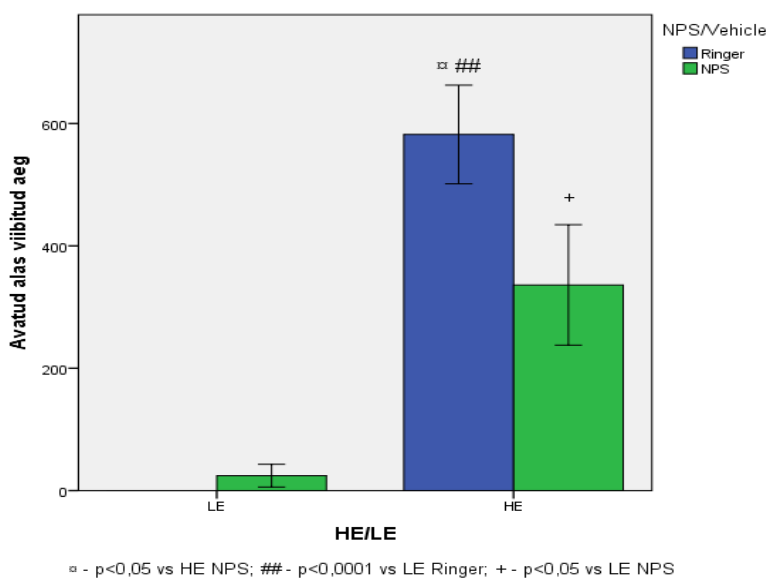


Joonis 1: Avatud alasse sisenemise latents uudiskasti testis gruppide lõikes



Joonis 2: Avatud alale lähenemised uudiskasti testis gruppide lõikes

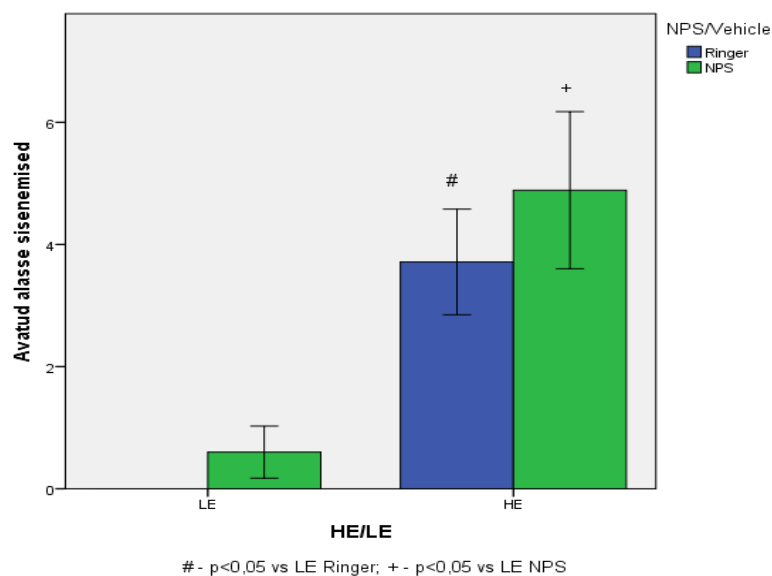
Avatud alas viibitud aja puhul ilmnes oluline koosmõju tunnuste HE/LE ning NPS/Ringer vahel ($F(1, 32)=5,15$, $p<0,05$) (Joonis 3). Lisaks ilmnes oluline erinevus HE ja LE loomade vahel ($F(1, 32)=56,26$, $p<0,0001$). LSD *post hoc* testi alusel ilmnes, et HE NPS grupi loomad viibisid avatud alas oluliselt vähem aega kui kontrollgrupi loomad.



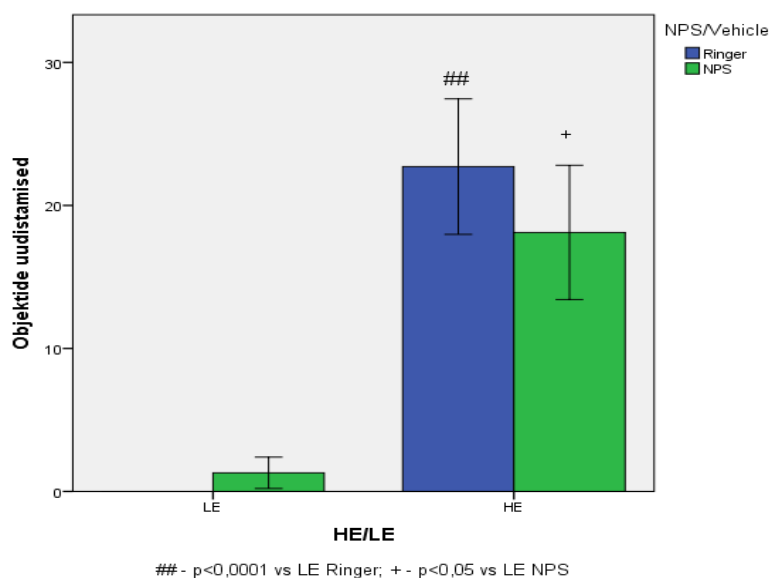
Joonis 3: Avatud alas viibitud aeg uudiskasti testis gruppide lõikes

HE loomadel olid jätkuvalt oluliselt kõrgemad tulemused nii avatud alasse sisenemiste arvus ($F(1, 32)=27,1$, $p<0,0001$) (Joonis 4), objektide uudistamises ($F(1, 32)=41,74$, $p<0,0001$) (Joonis 5), jooneületustes ($F(1, 32)=35,64$, $p<0,0001$) (Joonis 6), tõusude arvus ($F(1, 32)=25,76$, $p<0,0001$)

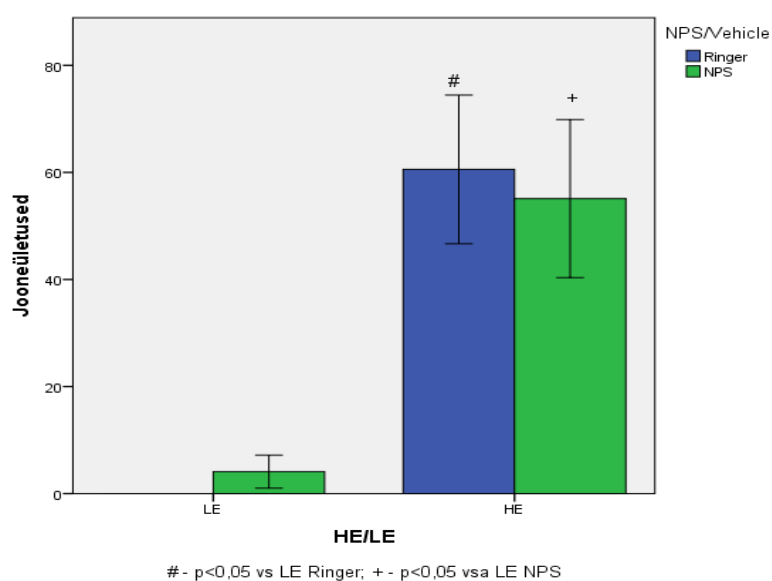
(Joonis 7) kui ka uudistamisjuhtude arvus ($F(1, 32)=38,1$, $p<0,0001$) (Joonis 8). LSD *post hoc* testi näitas samuti, et HE loomad sisenesid rohkem avatud alasse, uudistasid rohkem objekte, sooritasid rohkem jooneületusi ja tõusid rohkem tagakäppadele kui LE loomad, kuid HE ja LE grupi siseselt statistiliselt olulised erinevused puudusid.



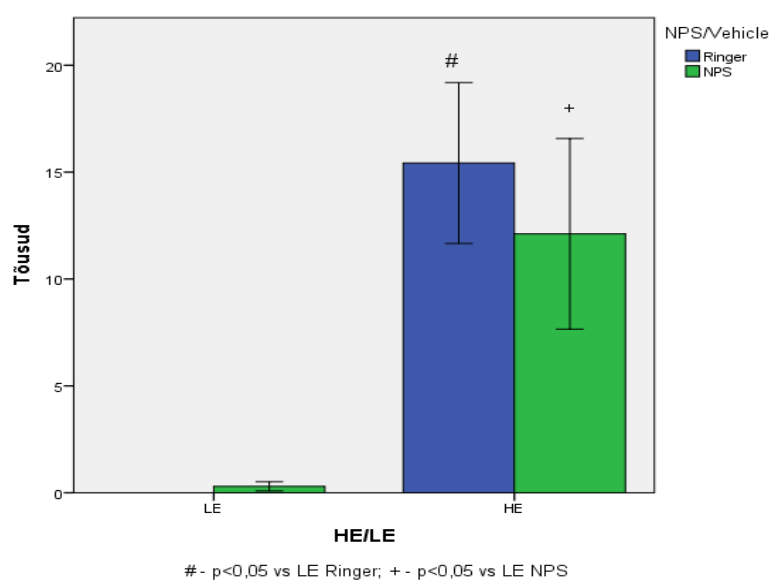
Joonis 4: Avatud alasse sisenemised uudiskasti testis gruppide lõikes



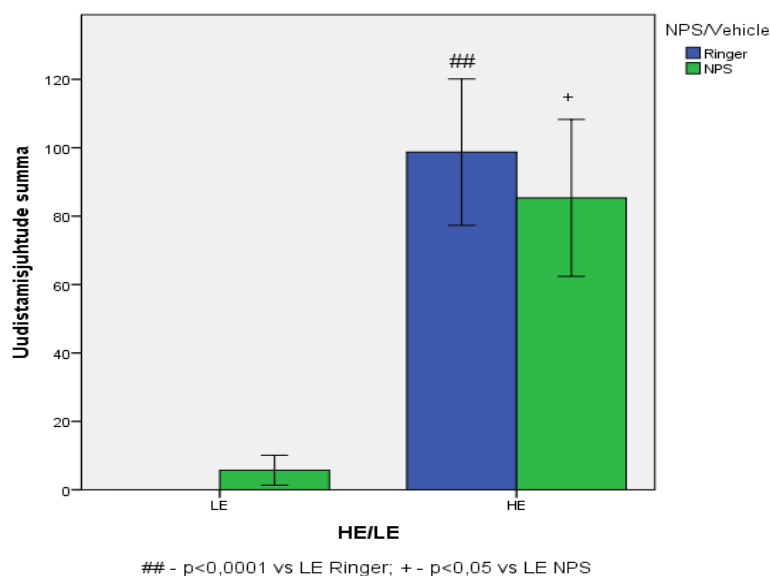
Joonis 5: Objektide uudistamise kordade arv uudiskasti testis gruppide lõikes



Joonis 6: Jooneületuste arv uudiskasti testis gruppide lõikes



Joonis 7: Tõusude arv uudiskasti testis gruppide lõikes

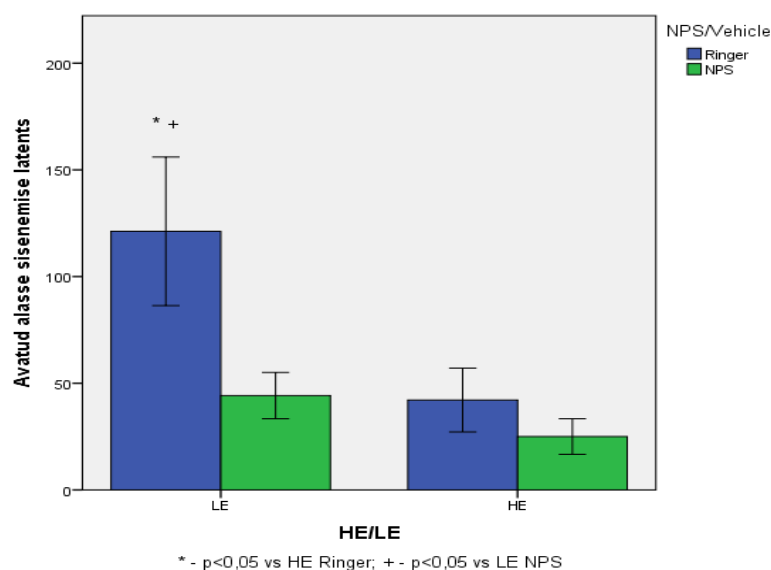


Joonis 8: Uudistamisjuhtude summa uudiskasti testis gruppide lõikes

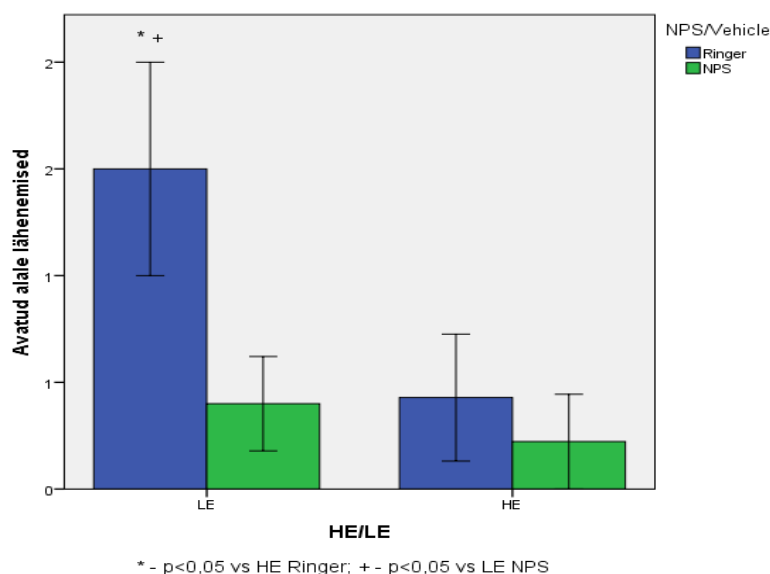
0-puuri

0-puuri tulemusi analüüsiti lähtuvalt avatud ossa sisenemiste arvust, avatud ossa lähenemiste arvust, avatud ossa sisenemise latentsist, avatud osas viibitud ajast ning avatud osas jooneületustest.

ANOVA põhjal ilmnes, et avatud ossa sisenemise latents ning avatud alale lähenemiste arv olid LE loomadel ANOVA põhjal oluliselt suuremad kui HE loomadel ($F(1, 32)=5,07$, $p < 0,05$; $F(1, 32)=6,58$, $p < 0,05$) (Joonis 9; joonis 10). LSD *post hoc* test näitas, et LE loomade grupis vähenes NPS-i mõjul nii avatud alasse sisenemise latents kui ka avatud alale lähenemiste arv. HE grupi siseselt aga statistiliselt olulisi erinevusi ei ilmnenud.

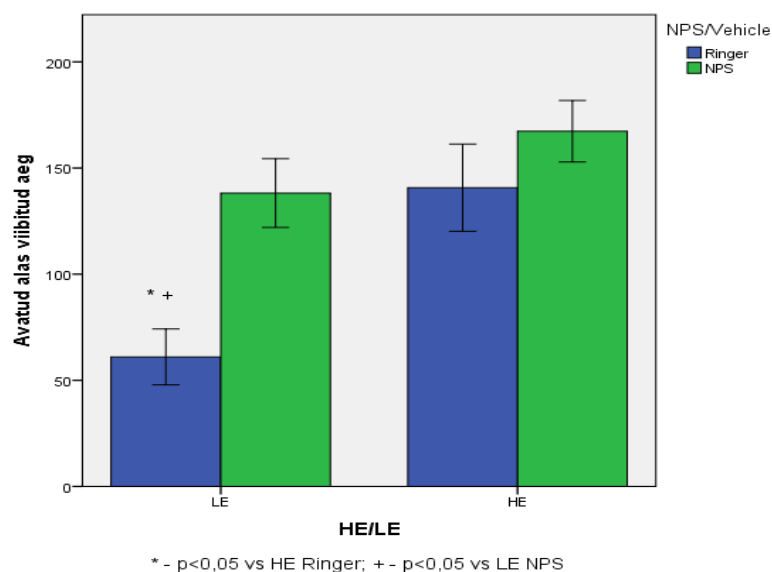


Joonis 9: Avatud alasse sisenemise latents 0-puuri testis gruppide lõikes

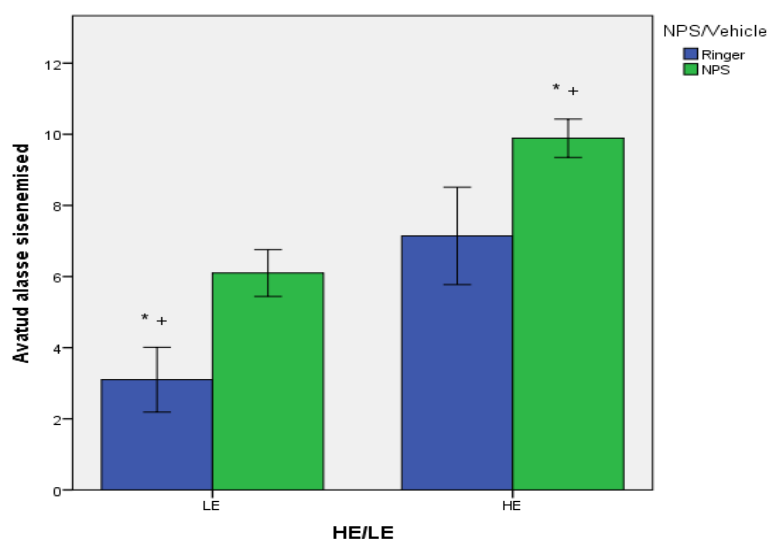


Joonis 10: Avatud alale lähenemised 0-puuri gruppide lõikes

Avatud osas viibitud aja (Joonis 11) ning avatud ossa sisenemiste arvu (Joonis 12) puhul esines nii HE/LE peamõju ($F(1, 32)=11,57$, $p < 0,05$; $F(1, 32)=20,25$, $p < 0,0001$) kui ka NPS/Ringer peamõju ($F(1, 32)=10,52$, $p < 0,05$; $F(1, 32)=10,9$, $p < 0,05$). Fisheri LSD *post hoc* test näitas, et NPS suurendas LE loomadel nii avatud osas viibitud aega kui ka avatud ossa sisenemiste arvu. HE grupi siseselt olulisi erinevusi avatud alas viibitud ajas ei ilmnenud, kuid avatud alasse sisenemisi tegid HE loomad NPS-i mõjul oluliselt rohkem.



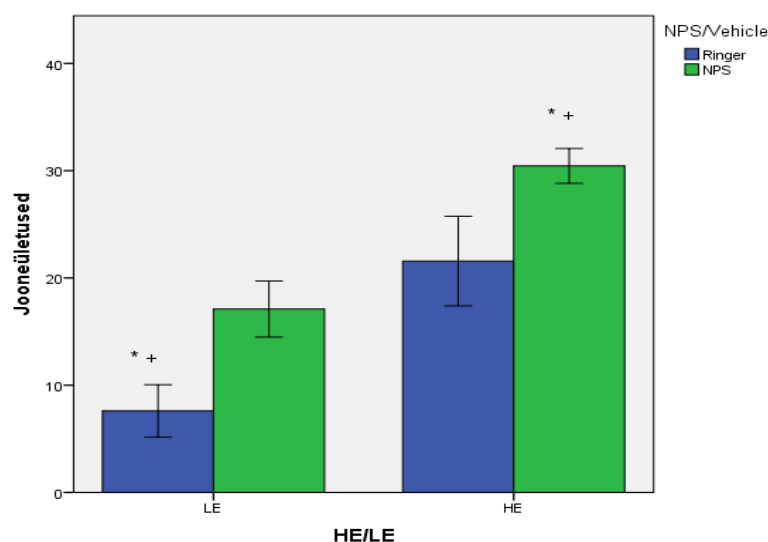
Joonis 11: Avatud osas viibitud aeg 0-puuri testis gruppide lõikes



* - $p < 0,05$ vs HE Ringer; + - $p < 0,05$ vs LE NPS

Joonis 12: Avatud alasse sisenemiste arv 0-puuri testis gruppide lõikes

HE loomadel oli oluliselt kõrgem jooneületuste arv võrreldes LE loomadega ($F(1, 32)=25,35$, $p < 0,0001$) (Joonis 13). Fisheri LSD *post hoc* testi alusel ilmneseid statistiliselt olulised erinevused mõlema grupi siseselt. Nii HE kui ka LE grupi siseselt tegid need loomad, kellele oli manustatud NPS-i, rohkem jooneületusi kui kontrollgrupi loomad.



* - $p < 0,05$ vs HE Ringer; + - $p < 0,05$ vs LE NPS

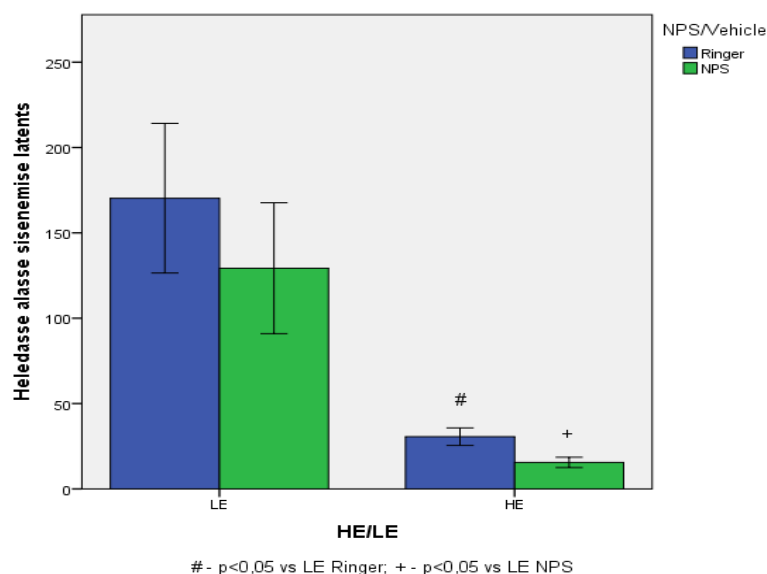
Joonis 13: Jooneületuste arv 0-puuri testis gruppide lõikes

Hele-tume puur

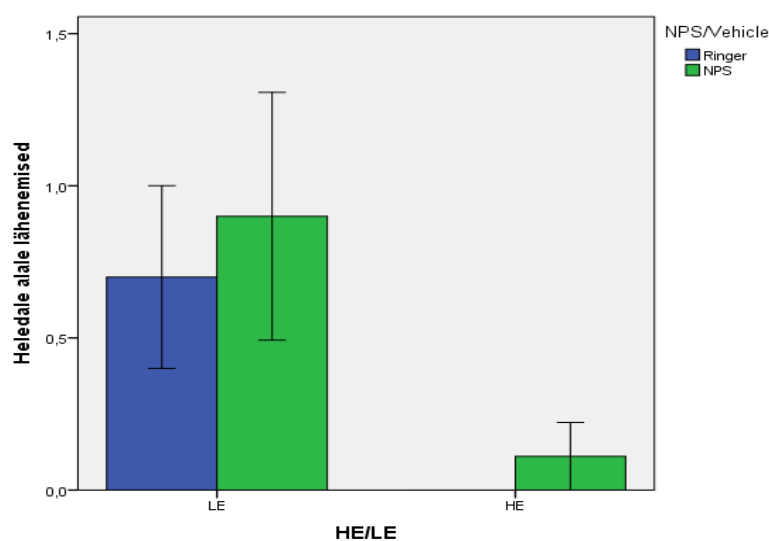
Hele-tume puuri tulemusi analüüsiti lähtudes heledasse alasse sisenemise latentsist, heledasse alasse sisenemiste arvust, heledale alale lähenemiste arvust, tõusudest, jooneületustest ja heledas alas

viibitud ajast.

Hele-tume puuri tulemuste analüüsist selgus, et LE loomadel oli kõrgem heledasse alasse sisenemise latents ning heledale alale lähenemiste arv võrreldes HE loomadega ($F(1, 32)=14,77$, $p<0,05$; $F(1, 32)=6,54$, $p<0,05$) (Joonis 14; joonis 15). Fisheri LSD *post hoc* test kinnitas samuti LE loomade oluliselt kõrgemat heledasse alasse sisenemise latentsi, kuid heledale alale lähenemiste osas statistiliselt olulisi erinevusi ei ilmnenud. Samuti puudusid statistiliselt olulised erinevused gruppide siseselt.

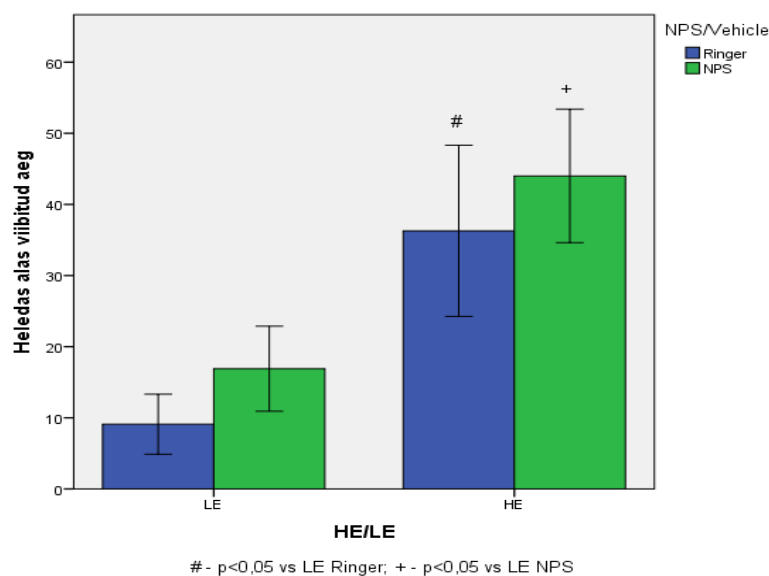


Joonis 14: Heledasse alasse sisenemise latents hele-tume puuris gruppide lõikes

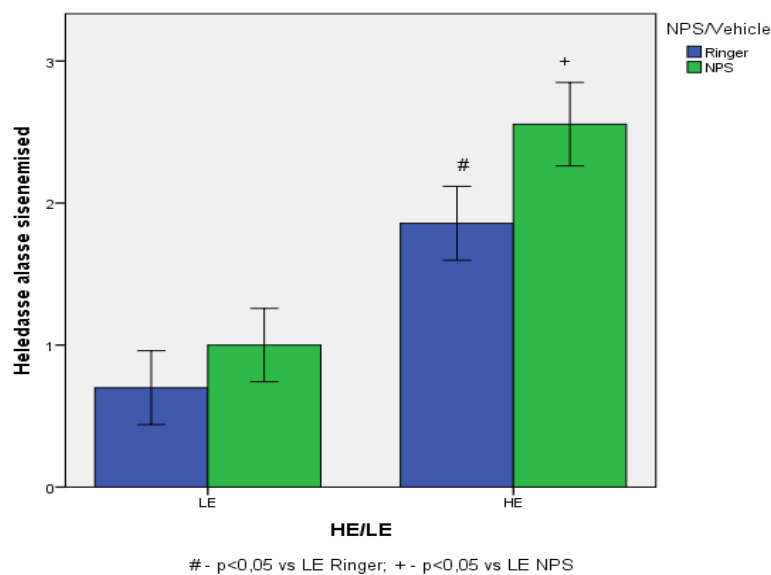


Joonis 15: Heledale alale lähenemised hele-tume puuris gruppide lõikes

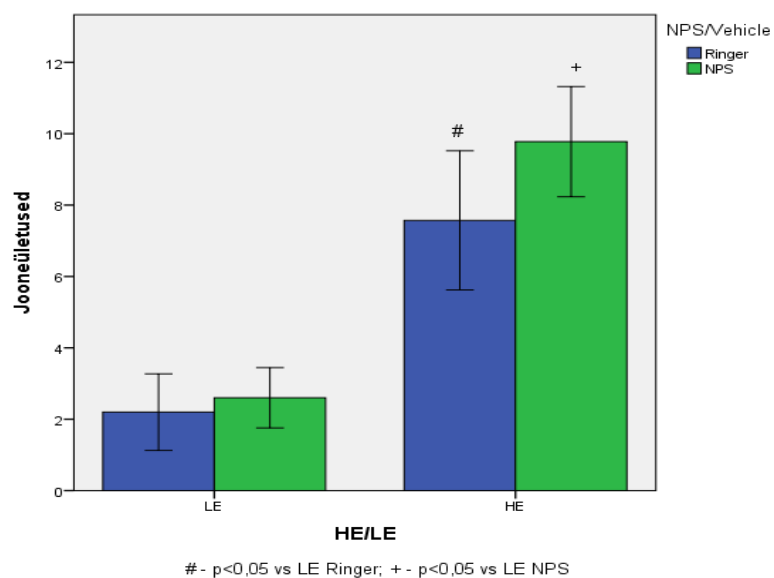
ANOVA põhjal ilmnemise olulised erinevused HE ja LE loomade vahel heledas alas viibitud ajas ($F(1, 32)=12,05$, $p<0,05$) (Joonis 16), heledasse alasse sisenemiste arvus ($F(1, 32)=24,49$, $p<0,0001$) (Joonis 17), jooneületustes ($F(1, 32)=22,23$, $p<0,0001$) (Joonis 18) ja tõusude arvus ($F(1, 32)=16,94$, $p<0,0001$) (Joonis 19), mille tulemused olid HE loomadel oluliselt kõrgemad. LSD *post hoc* testi alusel ilmnes, et HE loomad viibisid oluliselt kauem heledas alas, sisenesid rohkem heledasse alasse ning sooritasid seal rohkem jooneületusi ja tõuse kui LE loomad, kuid statistiliselt olulisi erinevusi HE ja LE gruppide siseselt ei ilmnenud ühegi nimetatud näitaja puhul.



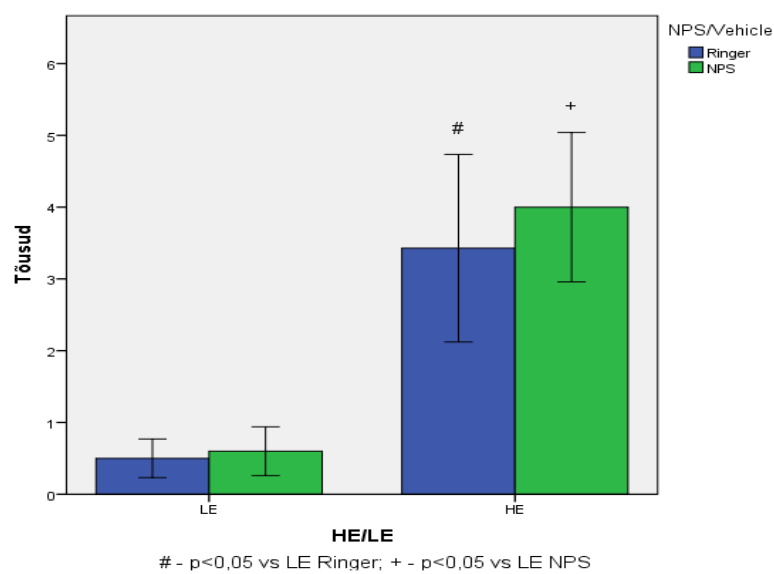
Joonis 16: Heledas alas viibitud aeg hele-tume puuris gruppide lõikes



Joonis 17: Heledasse alasse sisenemiste arv hele-tume puuris gruppide lõikes



Joonis 18: Jooneületuste arv hele-tume puuris gruppide lõikes



Joonis 19: Tõusude arv hele tume-puuris gruppide lõikes

Arutelu

0-puur

Sarnaselt Brauni ja kolleegide (2011) uuringu tulemustega sooritasid kõrgema ärevustasemega loomad vähem jooneületusi ning sisenesid vähem 0-puuri avatud ossa. NPS-i mõjul aga sooritasid LE loomad statistiliselt olulisel määral rohkem jooneületusi, sisenesid rohkem avatud ossa ning veetsid avatud alas rohkem aega kui kontrollgrupi loomad. Jooneületused on liikumisaktiivsuse peamiseks näitajaks, seega LE loomade liikumisaktiivsus NPS-i mõjul suurenes statistiliselt oluliselt määral ning avatud ossa sisenemised ja seal veedetud aeg viitavad ärevustaseme vähenemisele. Jooneületusi ning avatud alasse sisenemisi oli ka HE loomadel NPS-i mõjul statistiliselt oluliselt rohkem. Kuna HE loomade ärevustase on niigi oluliselt madalam kui LE loomade ärevustase, siis tõenäoliselt ei ole HE loomade sellised tulemused seotud ärevuse vähenemisega NPS-i mõjul, vaid on ilmselt põhjustatud hoopis NPS-i ärgastavast mõjust. Avatud alas viibitud aja poolest HE NPS ja LE NPS loomad oluliselt ei erinenud, mis näitab, et LE grupi loomade avatud alas viibitud aeg oli NPS-i mõjul tõusnud rohkem kui HE loomadel.

NPS-i ärevust vähendavat mõju näitab LE NPS grupi oluliselt madalam avatud alasse sisenemise latents võrreldes kontrollgrupiga. HE grupi siseselt aga avatud alasse sisenemise latentsis olulist muutust ei esinenud, mis viitab sellele, et NPS-i ärevust vähendav mõju avaldub rohkem just kõrge ärevuse tasemega loomadel.

0-puuris LE loomade avatud osale lähenemiste arv NPS-i mõjul vähenes, kuid samaaegselt suurenes oluliselt avatud ossa sisenemiste arv. Seega NPS vähendas LE loomade ärevust. Uudiskasti puhul ilmnemisele vastupidised tulemused – NPS-i mõjul LE loomade avatud osale lähenemiste arv suurenes, kuid avatud ossa sisenemiste arvus olulist tõusu ei olnud. Uudiskastis olid rotid kolmel korral – eelselekteerimisel kahel korral ning katsepäeval – ning on võimalik, et kahe esimese testimiskorraga kujunes loomadel kindel käitumismuster, mida NPS ei suutnud oluliselt mõjutada. Seega on huvitav, et uudiskasti testis lähenemiste arv avatud alale LE loomadel NPS-i mõjul suurenes, kuid ilmselt polnud mõju piisav, et väljakujunenud käitumismustrit muuta. HE grupis aga sisenesid loomad NPS-i mõjul samuti rohkem arv kordi avatud ossa. HE loomade puhul ei oleks jällegi loogiline seletada sellist tulemust ärevuse vähenemisega, kuna tegemist on niigi püsivalt vähe ärevate loomadega. See tähendab, et HE loomadel võib olla selline muutus seletatav NPS-i ärgastava mõjuga.

Uudiskasti test

Uudiskasti testiga on võimalik jagada loomad rühmadesse, kes on püsivalt kõrge neofobia/madala motivatsiooniga ning madala neofobia/kõrge motivatsiooniga uudistamise suhtes (Mällo et al., 2007). Algselt loodi uudiskasti test eritlemaks paremini ärevuse ja uudishimu aspekte farmakonide toimes (Harro, Orelund, Vasar & Bradwejn, 1995). Käesolevas töös kasutati uudiskasti testi ka katsepäeval NPS-i mõju uurimiseks.

Uuringud (Rizzi et al., 2008; Xu et al., 2004) on näidanud, et NPS mõjutab närilistel ärgastuse ja ärevusega seotud käitumist, seejuures ajusisene NPS-i manustamine põhjustab anksiolüütikumi/trankvillisaatori laadset efekti ning ärgastust samaaegselt (Lukas ja Neumann, 2012; Rizzi et al., 2008; Wegener et al., 2012; Xu et al., 2004). Uudiskasti testis NPS uudistamisaktiivsuse anksiolüütikumidele ja anksiogeenidele tundlikke näitajaid – avatud osas veedetud aeg, tõusud tagakäppadele, jooneületuste arv – ei mõjutanud. Kui HE rottidel võib efekti puudumine seletuda laaepektiga – aktiivsus on niigi maksimaalne loomulik aktiivsus -, siis LE rottidel NPS ei avaldanud sellist anksiolüütilist toimet nagu näiteks bensodiasepiinid. Ka ei lühendanud NPS LE rottidel avatud ossa sisenemise latentsi.

NPS-i mõjul tõusis LE rottide avatud alale lähenemiste arv uudiskastis. Avatud alale lähenemiste arvu tõusu NPS-i mõjul võib tõlgendada kui suurenenud ärevuse näitajat, kuna samal ajal ei tõusnud statistiliselt olulisel määral avatud alasse sisenemiste arv. Võib tõlgendada ka nii, et see tulemus viitab pigem NPS-i ärgastavale mõjule kui anksiolüütikumi laadsele efektile. Samas ei mõjutanud NPS HE loomade avatud alale lähenemiste ega ka sisenemiste arvu statistiliselt olulisel määral.

Teiseks vähenes NPS-i mõjul statistiliselt olulisel määral HE loomade avatud alas viibitud aeg. Avatud alas viibitud aja vähenemine HE loomadel on kummaline, kuna see pole kooskõlas NPS-i ärgastava ega anksiolüütilise mõjuga. Loomad, kes olid loomu poolest vähem ärevad ning veetsid algselt tunduvalt rohkem aega avatud alas, olid NPS-i mõjul rohkem “kodukambris”. Samuti ei toeta selline tulemus Xu ja kolleegide (2004) uuringu tulemust, kus leiti, et NPS põhjustab hüperaktiivset käitumist. Seda on lihtne seletada laaepektiga. Kui aga NPS on prokognitiivse toimega, võib HE rottidel lihtsalt kuluda vähem aega kõige huvitava tundmaõppimiseks. HE NPS rottide uudistamisaktiivsus oli kontrollgrupiga sama, olenemata sellest, et avatud alal veedeti vähem aega. Seega tegid NPS-i saanud loomad avatud alas veedetud ühes ajaühikus rohkem uudistamisakte.

Kuna NPS ei mõjustanud uudiskasti testi tulemusi põhinäitajate osas kuigi palju, võiks ka oletada, et NPS kasutatud annuses meie katsetingimustes toimet ei avalda ning leitud erinevused katserühmade vahel on pigem juhusliku iseloomuga. Sellise järeldusega ei ole aga kooskõlas 0-puuri testi tulemused.

0-puuri testis LE loomadel NPS-i mõjul avatud ossa lähenemiste arv vähenes ja sisenemiste arv suurenes, kuid uudiskasti testis oli vastupidi. 0-puuri testis on loomal võimatu keskkonnaga tutvuda, kui ta ei liigu. Uudiskastis aga on ligikaudne ülevaade olemas ka “kodukambrist” väljumata. See eristumine kahes testis ning üldse kolme katsu tulemused kokku, võivad tähendada seda, et NPS on eeskätt närvierguti-laadse toimega ja tõelist anksiolüütilist toimet ei olegi, kuid NPS-il pole ka paljudele närviergutitele omast pro-anksiogeenset efekti.

Hele-tume puur

Antud uurimuses hinnati hele-tume puuri testis avatud osasse sisenemise latentsi, avatud osas viibitud aega, avatud osasse sisenemiste arvu, avatud alale lähenemiste arvu, jooneületuste ning tõusude arvu.

Hele-tume puuri testi tulemused näitasid, et statistiliselt olulisi muutusi HE ja LE loomadel NPS-iga ei esinenud mitte ühegi vaadeldud näitaja puhul. Hele-tume puuri testis peetakse käitumisaktiivsuse tõusu valgustatud alas anksiolüütilise efekti näitajaks (Bourin & Hascoët, 2003). Selle alusel võib väita, et NPS-il puudus oluline anksiolüütiline mõju, kuna kummagi grupi puhul ei tõusnud statistiliselt olulisel määral käitumisaktiivsus. Samas on hele-tume puuri test rottidel ärevusvastase toime osas piiratud ennustusväärtusega. Oleks siiski vaja proovida suuremate NPS-annuste mõju selles testis, eriti kuna pea kõikide näitajate osas avaldus NPS-il anksiolüütilise toime tendents.

Kirjanduse loetelu

Bourin, M., Hascoët, M. (2003). The mouse light/dark box test. *European Journal of Pharmacology*, 463(1-3), 55-65.

Braun, A. A., Skelton, M. R., Vorhees, C. V., Williams, M. T. (2011). Comparison of the elevated plus and elevated zero mazes in treated and untreated male Sprague-Dawley rats: effects of anxiolytic and anxiogenic agents. *Pharmacology, Biochemistry, And Behavior*, 97(3), 406-415.

Crawley, J., Goodwin, F. K. (1980). Preliminary report of a simple animal behavior model of the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 13(2), 167-170.

Dellu, F., Mayo, W., Piazza, P. V., Le Moal, M., Simon, H. (1993). Individual differences in behavioral responses to novelty in rats. Possible relationship with the sensation-seeking trait in man. *Personality and Individual Differences*, 15(4), 411-418.

Harro, J., Orelund, L., Vasar, E., Bradwejn, J. (1995). Impaired exploratory behaviour after DSP-4 treatment in rats: implications for the increased anxiety after noradrenergic denervation. *European Neuropsychopharmacology*, 5(4), 447-455.

Hooks, M. S., Jones, G. H., Smith, A. D., Neill, D. B., Justice Jr, J. B. (1991). Individual differences in locomotor activity and sensitization. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 38(2), 467-470.

Kulkarni, S. K., Singh, K., Bishnoi, M. (2007). Elevated zero maze: a paradigm to evaluate antianxiety effects of drugs. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 29(5), 343-348.

Lukas, M., Neumann, I. D. (2012). Nasal application of neuropeptide S reduces anxiety and prolongs memory in rats: social versus non-social effects. *Neuropharmacology*, 62, 398-405.

Mochizuki, T., Kim, J., Sasaki, K. (2010). Microinjection of neuropeptide S into the rat ventral tegmental area induces hyperactivity and increases extracellular levels of dopamine metabolites in the nucleus accumbens shell. *Peptides*, 31(5), 926-931.

Mällo, T. (2008). *Exploratory behaviour and 50-kHz ultrasonic vocalizations in rats: behavioural and neurochemical profiles of persistent inter-individual differences* (Doctoral dissertation). Tartu Ülikooli Kirjastus.

Mällo, T., Alttoa, A., Kõiv, K., Tõnissaar, M., Eller, M., Harro, J. (2007). Rats with persistently low or high exploratory activity: Behaviour in tests of anxiety and depression, and extracellular levels of dopamine. *Behavioural Brain Research*, 177(2), 269-281.

Pape, H.-C., Jüngling, K., Seidenbecher, T., Lesting, J., Reinscheid, R. K. (2010). Neuropeptide S: A transmitter system in the brain regulating fear and anxiety. *Neuropharmacology*, 58(1), 29-34.

Paxinos G., Watson C. (2007). *The rat brain in stereotaxic coordinates* (6th ed.). Amsterdam: Academic Press.

Peet, K. (2013). Kroonilise sotsiaalse stressi mõju erineva uudistamisfenotüübiga rottidele (Seminaritöö). Tartu Ülikool.

Piazza, V. P., Rouge-Pont, E., Deminiere, J. M., Kharoubi, M., Le Moal, M., Simon, H. (1991). Dopaminergic activity is reduced in the prefrontal cortex and increased in the nucleus accumbens of rats predisposed to develop amphetamine self-administration. *Brain Research*, 567(1), 169-174.

Pierre, P. J., Vezina, P. (1997). Predisposition to self-administer amphetamine: the contribution of response to novelty and prior exposure to the drug. *Psychopharmacology*, 129(3), 277-284.

Pulga, A., Ruzza, C., Rizzi, A., Guerrini, R., Calo, G. (2012) Anxiolytic- and paniolytic-like effects of neuropeptide S in the mouse elevated T-maze. *European Journal of Neuroscience*, 36(11), 3531-3537.

Rizzi, A., Vergura, R., Marzola, G., Ruzza, C., Guerrini, R., Salvadori, S., Regoli, D., Calo, G. (2008). Neuropeptide S is a stimulatory anxiolytic agent: A behavioural study in mice. *British Journal of Pharmacology*, 154(2), 471-479.

Rouge-Pont, F., Piazza, P. V., Kharouby, M., Le Moal, M., Simon, H. (1993). Higher and longer stress-induced increase in dopamine concentrations in the nucleus accumbens of animals

predisposed to amphetamine self-administration. A microdialysis study. *Brain Research*, 602(1), 169-174.

Shepherd, J. K., Grewal, S. S., Fletcher, A., Bill, D. J., Dourish, C. T. (1994). Behavioural and pharmacological characterisation of the elevated “zero-maze” as an animal model of anxiety. *Psychopharmacology*, 116(1), 56-64.

Smith, K. L., Patterson, M., Dhillo, W. S., Patel, S. R., Semjonous, N. M., Gardiner, J. V., Ghatei, M. A., Bloom, S. R. (2006). Neuropeptide S stimulates the hypothalamo-pituitary-adrenal axis and inhibits food intake. *Endocrinology*, 147(7), 3510-3518.

Thiel, C. M., Müller, C. P., Huston, J. P., Schwarting, R. K. W. (1999). High versus low reactivity to a novel environment: behavioural, pharmacological and neurochemical assessments. *Neuroscience*, 93(1), 243-251.

Wegener, G., Finger, B. C., Elfving, B., Keller, K., Liebenberg, N., Singewald, N., Slattery, D. A., Neumann, I. D., Mathe, A. A. (2012). Neuropeptide S alters anxiety, but not depression-like behaviour in Flinders Sensitive Line rats: a genetic animal model of depression. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 15, 375-387.

Xu, Y-L., Reinscheid, R. K., Huitron-Resendiz, S., Clark, S. D., Wang, Z., Lin, S. H., Brucher, F. A., Zeng, J., Ly, N. K., Henriksen, S. J., de Lecea, L., Civelli, O. (2004). Neuropeptide S: A Neuropeptide Promoting Arousal and Anxiolytic-like Effects. *Neuron*, 43(4), 487-497.

Käesolevaga kinnitan, et olen korrektselt viidanud kõigile oma töös kasutatud teiste autorite poolt loodud kirjalikele töödele, lausetele, mõtetele, ideedele või andmetele. Olen nõus oma töö avaldamisega Tartu Ülikooli digitaalarhiivis DSpace.

Trine Uusen